

**Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Международный государственный экологический институт  
имени А. Д. Сахарова  
Белорусского государственного университета»**

**ФАКУЛЬТЕТ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

**КАФЕДРА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ И БИОХИМИИ**

**Усовершенствование биотехнологического способа  
получения цикло-ди-АМФ**

**Дипломная работа**

1-80 02 01 Медико-биологическое дело

**Исполнитель:**

студентка 5 курса 52063 группы  
дневной формы обучения \_\_\_\_\_ Хмелевская Карина Сергеевна

**Научный руководитель:**

доктор биол. наук, профессор,  
член-корр. НАН Беларуси \_\_\_\_\_ Зинченко Анатолий Иванович

**К защите допущена:**

**Заведующий кафедрой экологической химии и биохимии:**

кандидат хим. наук, доцент \_\_\_\_\_ Шахаб Сиямак Насер

МИНСК 2020

## РЕФЕРАТ

Усовершенствование биотехнологического способа получения цикло-ди-АМФ: 30 страниц, 8 рисунков, 3 таблицы, 39 источников, 3 приложения.

**Ключевые слова:** цикло-ди-АМФ, диаденилциклаза, адьювант, тельца включения, ферментативный синтез.

**Цель работы:** получить тельца включения, содержащие рекомбинантную диаденилатциклазу, изучить условия, в которых они проявляют максимальную активность, показать возможность использования телец включения для дальнейшего синтеза цикло-ди-АМФ.

**Методы исследований:** культивирование бактерий, выделение и очистка ферментов, очистка телец включения, спектрофотометрия, центрифугирование, денатурирующий гель-электрофорез белков, тонкослойная хроматография.

**Полученные результаты и их новизна:** в результате выполненной работы был наработан препарат (15 мл), содержащий тельца включения рекомбинантной ДАЦ, удельная активность которой в тельцах включения составила 23,89 Ед/мг белка, что значительно превышает удельную активность ранее использованного рекомбинантного ферментного препарата Sumo-ДАЦ (11,93 Ед/мг белка) и ДАЦ (14,04 Ед/мг белка).

Определены условия, в которых тельца включения проявляют максимальную ферментативную активность: температура – 55°C, pH в диапазоне от 9,0 до 10,0.

Таким образом, метод получения препарата позволяет в десятки раз повысить продуцирующую способность штамма-продуцента, а также неоднократно использовать тельца включения для более быстрого и упрощенного метода получения фармакологически перспективного цикло-ди-АМФ.

**Степень использования.** Результаты работы могут быть использованы в фармакологии, антимикробной терапии, онкопатологии и в учебном процессе по дисциплинам медицинского направления.

**Область применения.** Биология, биотехнология и медицина.

## РЭФЕРАТ

Удасканаленне біятэхналагічнага спосабу атрымання цыкла-дзі-АМФ: 30 старонак, 8 малюнкаў, 3 табліцы, 39 крыніц, 3 прыкладанні.

**Ключавыя словы:** цыкла-дзі-АМФ, дзіадэнілатцыклаза, ад'ювант, цельца ўключэння, ферментатыўны сінтэз.

**Мэта работы:** атрымаць цельца ўключэння, якія змяшчаюць рэкамбінантную дзіадэнілатцыклазу, вывучыць ўмовы, у якіх яны праяўляюць максімальную актыўнасць, паказаць магчымасць выкарыстання целец ўключэння для далейшага сінтэзу цыкла- дзі -АМФ.

**Метады даследаванняў:** культываванне бактэрыі, вылучэнне і ачыстка ферментаў, ачыстка целец ўключэння, цэнтрыфугаванне, спектрафотаметрыя, дэнатуруючы гель-электрафарэз бялкоў, тонкапластовая храматаграфія.

**Атрыманьня вынікі і іх навізна:** у выніку выкананай працы быў напрацаваны прэпарат (15 мл), які змяшчае цельца ўключэння рэкамбінантнай дзіадэнілатцыклазы, якая валодае актыўнасцю 23,89 Адз/мг бялку, што значна перавышае ўдзельную актыўнасць раней выкарыстанага рэкамбінантнага ферментнага прэпарата Sumo-ДАЦ (11,94 Адз/мг бялку) і ДАЦ (14,04 Адз/мг бялку) – прадукцэнтаў ДАЦ. Вызначаны ўмовы, у якіх цельца ўключэння праяўляюць максімальную ферментатыўную актыўнасць: тэмпература-55°C, рН ў дыяпазоне ад 9,0 да 10,0.

Такім чынам, метады атрымання прэпарата дазваляе ў дзясяткі разоў павялічыць прадукуючую здольнасць штаму-прадукцэнта, а таксама неаднаразова выкарыстоўваць цельца ўключэння для больш хуткага і спрошчанага метаду атрымання фармакалагічна перспектыўнага цыкла- дзі -АМФ.

**Ступень выкарыстання.** Вынікі работы могуць быць выкарыстаны ў фармакалогіі, антымікробнай тэрапіі, анкапаталогіі і ў навучальным працэсе па дысцыплінах медыцынскага напрамку.

**Вобласць прымянення.** Біялогія, біятэхналогія, медыцына.

## ABSTRACT

Improvement of the biotechnological method for producing cyclo-di-AMP: 30 pages, 3 tables, 8 figures, 39 sources, 3 annexes.

**Keys words:** cyclo-di-AMP, diadenylate cyclase, adjuvant, inclusion bodies, enzymatic synthesis.

**Purpose:** obtain inclusion bodies containing recombinant diadenylate cyclase, to study the conditions under which they exhibit maximum activity, to show the possibility of using inclusion bodies for further synthesis of cyclo-di-AMP.

**Research methods:** culturing of bacteria, isolation and purification of enzymes, purification of inclusion bodies, centrifugation, spectrophotometry, denaturing gel electrophoresis of proteins, chromatography.

**The obtained results and their novelty:** as a result of the work performed, a preparation (15 ml) was accumulated, containing the inclusion bodies pure recombinant diadenylate cyclase, having an activity of 23.89 Un/mg protein, which significantly exceeds the specific activity of previously used recombinant enzyme preparation Sumo-dac (11.94 Un/mg protein) and dac (14.04 Un/mg protein) - producers of DAC. The conditions under which inclusion bodies exhibit maximum enzymatic activity are determined: temperature-55°C, pH in the range from 9.0 to 10.0.

Thus, the method of obtaining the drug allows to increase the producing ability of the producer strain tenfold, and also to repeatedly use inclusion bodies for a faster and simplified method of obtaining a pharmacologically promising cyclo-di-AMP.

**Degree of use:** The results of the work can be used in pharmacology, antimicrobial therapy, oncopathology and in the educational process in the medical disciplines.

**Application area.** Biology, biotechnology and medicine.